

云南五个不同地区烟草花叶病毒外壳蛋白基因的序列比较*

丁 铭¹, 方 琦¹, 张丽珍¹, 杨录明², 汪继玲², 李滢芳², 张仲凯^{1**}

(1. 云南省农业科学院生物技术研究所, 云南昆明 650223; 2. 云南红河卷烟厂, 云南弥勒 652300)

Comparison of the Coat Protein Gene Sequence of *Tobacco mosaic virus* Isolated from Different Regions in Yunnan ProvinceDING Ming¹, FANG Qi¹, ZHANG Li-zhen¹, YANG Lu-ming², Wang Ji-ling², LI Yan-fang², ZHANG Zhong-kai^{1**}

(1. Institute of Biotechnology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; 2. Honghe Cigarette Factory, Mile 652300, China)

Abstract: Five *Tobacco mosaic virus* isolates, obtained from tobacco leaves showing typical symptom in Qujing, Honghe, Dali, Chuxiong and Yuxi in Yunnan province, were selected and studied from 637 TMV samples. Using a pair of primers specific for TMV-U1 strain, a specific fragment of 530bp including the TMV coat protein gene was amplified using IC-PCR. The products of PCR were cloned and sequenced. The nucleotide and amino acid sequences of the coat protein of the five isolates were found to be very similar each other and have more than 90% sequence identity with TMV-U1, TMV-B, TMV-P, TMV-FUJIAN, although minor differences existed among them. The results showed that the five isolates from Yunnan province belong to TMV-U1 strain.

Key words: *Tobacco mosaic virus*; CP gene; Cloning; Sequence analysis

关键词: 烟草花叶病毒; 外壳蛋白基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S432.1

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0076-03

烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 是烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 中的典型成员, 具有极广的寄主范围, 可以侵染 30 个科的 310 多种植物, 为单组份正链 ssRNA 病毒, TMV 基因组 RNA 由 6395 个核苷酸组成, 共有 4 个 ORF, 分别编码 183kDa、126 kDa、30 kDa 和 17.5 kDa 蛋白^[1, 2]。

云南烟草常年种植面积保持在 27 万公顷左右, 在云南农业产业结构及经济结构中具有重要的支柱作用。通过近两年的调查和检测, 我们发现在云南省大部分地区, TMV 的发生流行呈较快的上升趋势, 部分优质烟生产区烟草花叶病毒病的发生率高达 90% 以上。本研究试图通过对 TMV 外壳蛋白基因进行克隆及序列分析, 与国内外报道的主要株系的同一基因进行比较, 探明云南 TMV 的主要株系归属。

1 材料与方 法

1.1 材 料

烟草花叶病毒五个分离物分别采自云南省烟草主产区, 表现出典型花叶、疱斑、绿岛等不同症状类型的代表性标样, 经 TAS-ELISA 法和电镜负染色法检测属于 TMV 的 637 个分离物中选取。五个分离物采集地点为: TMV-QJ (曲靖)、TMV-HH (红河)、TMV-DL (大理)、TMV-CX (楚雄)、TMV-YX (玉溪)。各分离物经心叶烟三次单斑纯化后, 繁殖保存于普通烟 K326 (*Nicotiana tabacum* var. K326) 中。受体: *E. coli* 菌株 DH5 α 由本实验室保存。质粒 pGEM-T Vector 为 Promega 公司产品。TMV 兔抗血清为本实验室制备。cDNA 合成试剂

收稿日期: 2003-07-08, 修回日期: 2003-09-01

* 基金项目: 国家烟草专卖局科技项目 (110200001006B), 红河烟厂科技项目 (HY2001TCS003) 资助。

作者简介: 丁铭 (1973-), 男, 云南昆明籍, 硕士, 助理研究员, 从事植物病毒学研究。

** 通讯作者: 张仲凯 (1966-), 男, 彝族, 云南昌宁籍, 研究员, 从事植物病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 0871-5183204, E-mail: zhongkai99@sina.com

盒、克隆试剂盒、限制性内切酶购自 Promega 公司, PCR 产物提纯试剂盒、质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, PCR 扩增试剂盒购自 Sangon 公司, 其它试剂及耗材分别购自华美公司和 Takara 公司。

1.2 病毒外壳蛋白基因的免疫捕捉 PCR (IC-PCR) 及扩增产物的纯化

引物设计参见王芳等^[3], 根据已报道的 TMV U1 株全基因序列设计引物。引物序列如下:

P1: 5' -ATGGATCCGCCGAATCGGATTCGTT- 3'

BamH I

P2: 5' -ATGGATCCTACCTCAAGTTGCAGGAC-3'

BamH I

其中 P1 (除酶切位点和保护碱基外) 与 TMV U1 株核酸序列的 5689-5706 碱基序列相同, P2 (除酶切位点和保护碱基外) 与 TMV U1 株核酸序列的 6183-6201 碱基序列相同。PCR 反应体系为 50μL, 循环参数: 94℃ 5min, 94℃ 1min, 55℃ 45s, 72℃ 1min, 重复 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。

免疫捕捉 PCR 参见肖火根等^[5], 略有改进。在 PCR 反应管中加入稀释至 1:500 的烟草花叶病毒免疫兔多抗血清, 4℃ 包被过夜或 37℃ 2h, TBST 洗涤 3 次, 病叶加入 50 倍病毒抽提缓冲液研磨, 3000r/min 离心 2min, 取 100μL 上清液加入 PCR 管中 37℃ 温育 3h, TBST 洗涤 3 次, H₂O 洗 1 次, 短暂离心, 吸去余液。Promega 公司 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 第一链。取 10μL 反转录产物进行 PCR 反应。1% 琼脂糖电泳, 50μg/mL 溴化乙锭中染色 20min, GDS 照相记录。采用 QIAGEN 公司 QIAquick PCR Purification Kit 纯化 PCR 产物。

1.3 PCR 扩增产物的克隆

PCR 纯化产物直接采用 Promega 公司 pGEM-T Vector system I Kit 连接程序连接, 转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑选择、PCR 及酶切鉴定筛选阳性克隆。

1.4 序列分析

五个分离物的 CP 基因序列测定由上海生工完成。测定时, 每个重组质粒均选取独立 PCR 获得的

两个克隆, 进行单向测序, 以确定正确的碱基序列。获得的序列利用 DNAsis 软件进行数据处理。用于序列比较的几种主要烟草花叶病毒株系: TMV-U₁^[7]、TMV-B^[6]、番茄花叶病毒 (ToMV-L)^[12]、辣椒轻斑驳病毒 S 株系 (PMMV-S)^[9]、烟草轻绿花叶病毒 (TMGMV)^[10]、黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV)^[13]、TMV 中国株系 (GenBank: AF155507)、TMV-P^[8]、齿兰环斑病毒 (ORSV-S1)^[11]、TMV-FUJIAN。

2 结果与讨论

2.1 目的基因的 IC-PCR 扩增

各分离物经 IC-PCR 扩增其 CP 基因, 电泳检测, PCR 产物均为一长约 500bp 的片段, 而且只含有该片段, 与设计要求的预期大小一致。

2.2 扩增产物的克隆与重组子筛选

转化平板挑取白色菌落进行 PCR 检测, 检测结果表明所挑取的菌落含有插入片段, 分别命名为 pTMVQJ、pTMVHH、pTMVDL、pTMVCX、pTMVYX, 提取质粒, *BamH* I 酶切后五个重组质粒均能切下一条约 500bp 的片段。

2.3 五个分离物 CP 基因及编码的氨基酸的序列分析

所得五个分离物的克隆用通用引物 T7、SP6 进行序列测定, 每个分离物的两个重复克隆所得外源片段序列完全一致。测得插入片段全长均为 530bp。五个分离物 CP 基因 GenBank 登录号为: AF516913、AF516912、AF516911、AF516910、AF493053。除去引物及 CP 基因 ORF 外的碱基, 五个分离物的 CP 基因均为 480 个碱基, 编码 159 个氨基酸。

五个分离物 CP 基因核苷酸序列之间同源性都在 95.8% 以上, 其中 TMV-HH 与 TMV-QJ 的核苷酸序列同源率达到 100%, 两个分离物完全相同, 表明五个分离物在 CP 基因核苷酸序列同源性水平上属于同一病毒株系。

CP 基因核苷酸序列推导的五个分离物 CP 氨基酸序列的同源性在 98%~100% 之间, 只分别在第 4、13、61、120 位氨基酸不相同, 因此各分离物在 CP 氨基酸序列同源性水平上应属于同一株系 (图 1)。

TMV-QJ	MSYNIITPSQ	FVFLSSAWAD	PIELINLCTN	ALGNQFQTQQ	ARTVVQRQFS	EVWKPSPQVT	VRFPSDFKV	YRYNAVLDP	80
TMV-HH	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	80
TMV-DL	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	80
TMV-CX	***S*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	80
TMV-YX	*****	**S*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	80
TMV-QJ	VTALLGAFDT	RNRRIEVENQ	ANPTTAETLD	ATRRVDDATV	AIRSAINLV	VELIRGTGSY	NRSSFESSG	LVWTSGPAT	160
TMV-HH	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	160
TMV-DL	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	160
TMV-CX	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	160
TMV-YX	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	160

图 1 五个分离物的 CP 基因编码的氨基酸序列比较

Fig. 1 The comparison of the CP amino acid sequences of five isolates

云南 TMV 各分离物 CP 核苷酸序列与氨基酸序列分别与同属的其他病毒或株系进行了比较。各分离物 CP 核苷酸序列和氨基酸序列与 TMV-U₁、TMV-B、TMV-FUJIAN、TMV-P 株同源率都在 90% 以上, 但无论在 CP 基因核苷酸序列还是 CP 氨基酸序列方面都存在一定的差异。

从云南五个主栽烟区采集的五个分离物在核苷酸序列相互间比较有 27 个碱基存在差异, 但由此推导出的 CP 氨基酸序列只有 4 个氨基酸位点不同, 主要是 TMV-DL、TMV-CX、TMV-YX 分离物出现变化, 因此云南这五个主栽烟区的 TMV 分离物应属于同一株系。

云南五个分离物均同 TMV-U₁、P、B 株和福建分离物有较高的同源率(其中 B 株和福建分离物均为我国大陆鉴定的株系)都在 90% 以上, 而与 TMV 中国株系的同源率较低, 均为 70%~80% 之间, 同以往报道的云南 TMV 分离物相比较, 均有一定差异^[3,4], 因此云南五个分离物与 TMV 中国株应属于同种病毒不同的株系。由于云南五个 TMV 分离物与 TMV-U₁ 株 CP 核苷酸和氨基酸序列同源性分别达到 94.5% 和 97.5% 以上, 因此, 我们将云南的五个分离物归属为 TMV-U₁ 株系。

TMV 云南分离物的核苷酸序列和氨基酸序列与国内普通株等已报道的株系相比, 都表现出一定的差异, 各分离物之间也存在一定的差异, 这种差异同云南多海拔、多气候带分布的特点有一定的相关性, 将对其致病性差异作进一步的研究。

参考文献

- [1] 田波, 裴美云. 植物病毒比较诊断指南[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [2] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] 李凡, 周雪平, 李德葆, 等. 云南烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因克隆及序列分析[M]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(3): 261-265.
- [4] 王芳, 颀波, 黄兴奇. 云南烟草花叶病毒外壳蛋白基因的分离克隆及序列分析[J]. 西南农业学报, 1999, 12(2): 7-11.
- [5] 肖火根, 胡晋生. 木瓜环斑病毒 RT-PCR、IC-PCR 和 DB-PCR 检测技术研究, 植物病理学研究进展[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1999.
- [6] 薛朝阳, 周雪平. 烟草花叶病毒蚕豆株系基因组全序列分析及结构特征[J]. 中国科学: C 辑生命科学, 1999, 29(6): 655-662.
- [7] Geolet P, Bulter L G P, Akam P J G, *et al.* Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA[J]. Proc Natl Acad. Sci USA, 1982, 79, 5818-5822.
- [8] Alexandr M A V, Soares R M, Rivas E B, *et al.* Characterization of a strain of tobacco mosaic virus from Petunia[J]. Phytopathology, 2000, 148: 11-12, 601-607.
- [9] Alonso E, Garcia-Luque I, Dela Cruz, *et al.* Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, aresistente-breaking tobamovirus in pepper[J]. J Gen Virol, 1991, 72: 2875-2884.
- [10] Solis I, Garcia-Arenal F. The complete nucleotide sequence of the genomic RNA of tobamovirus tobacco mild green mosaic virus. Virology, 1990, 177: 553-558.
- [11] Dubs M C, Van Regenmortel MHV. Odontoglossum ringspotvirus coat protein sequence and antigenic comparisons with other tobamovirus[J]. Arch Virology, 1990, 115: 239-249.
- [12] Ohno T, Aoyagi M, Yamanashi Y, *et al.* Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome[J]. J Biochem, 1994, 96: 1915-1923.
- [13] Ugaki M, Tomiyama M, Kakatani T, *et al.* The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle wosaic virus (SH strain) genomic RNA [J]. J Gen Virol, 1991, 72: 1487-1495.